

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02245650 A**

(43) Date of publication of application: 01 . 10 . 90

(51) Int. Cl.

**G01N 27/327**(21) Application number: **01067064**

(22) Date of filing: 17 . 03 . 89

(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**(72) Inventor: **KAWAGURI MARIKO  
FUJITA MAYUMI  
NANKAI SHIRO  
IIJIMA TAKASHI**(54) **BIOSENSOR**

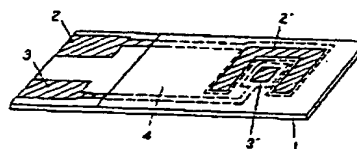
(57) Abstract:

**PURPOSE:** To measure a density of a substrate in an organism sample while improving a measuring accuracy by forming an enzyme reaction layer comprising an oxidation/reduction enzyme, a hydrophilic high polymer and an electron acceptor on a surface of an electrode system.

**CONSTITUTION:** For example, a glucose sensor comprises a print of conductive carbon paste on an insulating substrate 1 to form an electrode system comprising a counter electrode 2 and a measuring pole 3. Then, an insulating paste is printed to cover the electrode system partially to form an insulation layer 4 by an overheating processing. Then, the surfaces of electrochemically acting parts 2' and 3' work are coated with an aqueous solution of carboxymethyl cellulose as one kind of hydrophilic high polymer to cover the surfaces and after a drying, glucose oxidase as oxidation/reduction enzyme is dissolved into a phosphoric acid buffer liquid to coat and dry. Moreover, toluene mixed with a fine crystal of potassium ferricyanide as electron acceptor is dripped on the parts to obtain an enzyme reaction layer 5 by forming a potassium ferricyanide layer. A potassium periodate as

interfering material removing part 6 is supported near the electrode 2 to make a sample supply section.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&amp;Japio



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-245650

⑬ Int.Cl.<sup>9</sup>  
G 01 N 27/327

識別記号 庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)10月1日

7363-2G G 01 N 27/30 3 5 3 R  
7363-2G J

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全5頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 平1-67064

⑰ 出 願 平1(1989)3月17日

⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
⑳ 代 理 人	弁理士 栗 野 重 孝	外1名	

明 細 書

1. 発明の名称

バイオセンサ

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極とからなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子と電子受容体とから主になる酵素反応層を設け、さらに、妨害物質除去部を付加し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定するように構成したことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 少なくとも測定極と対極とからなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子と界面活性剤を含有した電子受容体とから主になる酵素反応層を設け、さらに、妨害物質除去部を付加し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定するように構成したことを特徴とする

バイオセンサ。

(3) 妨害物質除去部が酸化力を有する物質からなる請求項1または2記載のバイオセンサ。

(4) 妨害物質除去部に酵素を担持した請求項1または2記載のバイオセンサ。

(5) 妨害物質除去部の酵素が固定化されている請求項4記載のバイオセンサ。

(6) 電極系が、絶縁性の基板上にスクリーン印刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなる請求項1または2記載のバイオセンサ。

(7) 電極系の上に、酵素反応層及び妨害物質除去部を内側に含むようにカバーを設置した請求項1または2記載のバイオセンサ。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分につい

て、試料液の希釈や攪拌などを行なう事なく簡易に定量しうる方式として、第5図に示すようなバイオセンサを提案した。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極2、3を形成し、前記電極2、3上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体とからなる酵素反応層5を形成したものである。試料液を酵素反応層5へ滴下すると、酸化還元酵素と電子受容体とが試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

#### 発明が解決しようとする課題

この様な従来の構成では、試料液中に還元性の物質が含有されている場合、反応時に電子受容体と反応したり電極反応が影響されて応答がばらついた。

#### 課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するために、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極とからなる電極

系センサの一例について示したもので、バイオセンサの斜視図と縦断面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定極3からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極2、3の電気化学的に作用する部分2'、3'を残すように、絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理をして絶縁層4を形成する。前記部分2'、3'の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるCMC（カルボキシメチルセルロース）の水溶液を塗布し、45℃で30分乾燥した。得られたCMC層の上に酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ（GOD）をpH5.8のリン酸緩衝液に溶解したものを塗布した後、室温で乾燥した。その上に有機溶媒としてトルエンに電子受容体であるフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下し、室温で放置してトルエンを気化させることによりフェリシアン化カリウム層を形成した。この

系を設け、酵素及び電子受容体の試料液との反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子と電子受容体とから主になる酵素反応層を形成し、さらに妨害物質除去部を付加するものである。

#### 作 用

本発明によれば、電極系をも含めたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液をセンサに添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。しかも、試料の添加時に妨害物質除去部で試料液中の還元性の物質を酸化するため応答への影響がなくなり、安定した応答が得られる。

#### 実 施 例

以下、本発明の一実施例について説明する。

#### 実施例1

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図及び第2図は、グルコー

ようにして、酵素反応層5を形成した。さらに、電極2の近くに妨害物質除去部6として過ヨウ素酸カリウムを担持し、試料の供給部とした。

上記のように構成したグルコースセンサに試料液として血清を供給部に10 $\mu$ l滴下し、2分後に対極2を基準にして測定極3にアノード方向へ+0.8Vのパルス電圧を印加し5秒後の電流を測定する。血清を添加すると、妨害物質除去部6として担持されていた過ヨウ素酸カリウムにより血清中の還元物質であるアスコルビン酸などが酸化されて酵素反応層5のフェリシアン化カリウムと反応するのを妨害する。さらに、妨害物質が除去された血清によりフェリシアン化カリウムが溶解し、血清中のグルコースが酵素反応層5において酸化される際、フェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られる。この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ500 $\mu$ g/dl

という高濃度まで良好な直線性が得られた。

つぎに、グルコース標準液に還元性物質の代表としてアスコルビン酸を10mg/dl加え、測定したところ本実施例のように過ヨウ素酸カリウムのある場合はほとんどアスコルビン酸の影響がみられなかったが、過ヨウ素酸カリウムが無い場合は、グルコース濃度100mg/dlにおいて約10%も高い応答が得られた。これは、アスコルビン酸がフェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カリウムが生成し、見かけ上、正の誤差が生じたものと考えられる。

本実施例によれば、過ヨウ素酸カリウムを妨害物質除去部8として担持することにより、アスコルビン酸を前もって酸化して影響を除去することが出来た。

#### 実施例2

実施例1に示したようにしてCMC-GOD層を形成した後、フェリシアン化カリウム層を形成する際トルエンに界面活性剤としてレシチン（ホスファチジルコリン）を溶解して1wt%溶液を

血液を滴下したところ、レシチン層によりすみやかにひろがり反応が始まったため、8μlという微量のサンプルでも再現性のよい応答が得られた。サンプルが少量になると、妨害物質除去部としての過ヨウ素酸カリウムの担持量も少なくても効果がみられた。

レシチンのかわりにポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル（商品名：トリトンX）を用いたところ、フェリシアン化カリウムの微粒子をトルエン中に分散させるためには0.1%以上必要であったが、レシチンと同様に良好なフェリシアン化カリウム層が形成できた。界面活性剤としては、前記の例の他に、オレイン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなど、電子受容体を有機溶媒に分散させ、かつ酵素活性に影響をおよぼさないものであれば、特に制限されることはない。

親水性高分子としてCMCの他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、でんぷん系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、ア

弱製し、これにフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを用いてフェリシアン化カリウムとレシチンの層を形成した。こうして、本実施例の酵素反応層を設けた。

レシチンの濃度が0.01wt%以上になるとフェリシアン化カリウムがうまくトルエン中で分散したため滴下が容易となり、3μlの微量な液でも薄膜状のフェリシアン化カリウム-レシチン層が形成できた。レシチンがない場合は、フェリシアン化カリウム層が不均一に形成されたり基板をまげるとはがれるという欠点が見られたが、レシチンを添加することにより均一ではがれにくいフェリシアン化カリウム層が容易に形成できた。レシチンの濃度が高くなるとともに、フェリシアン化カリウム層のはがれにくくなるが、フェリシアン化カリウムの溶解速度も落ちるため、0.01-3wt%が適当と考えられる。

上記センサにグルコース標準液を滴下して実施例1と同様にして応答を測定したところ、グルコース濃度500mg/dlまで直線性が得られた。さらに、

クリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は容易に水溶液とすることができ、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を電極上に形成することができる。

電子受容体を混合する有機溶媒としては、トルエンや石油エーテルなど、GOD活性および印刷電極への影響の少ないものであればよい。

電極系を形成する方法としてのスクリーン印刷は、均一な特性を有するディスプレイタイプのバイオセンサを安価に製造することができ、特に、価格が安く、しかも安定した電極材料であるカーボンを用いて電極を形成するのに好都合な方法である。

試料中の還元性物質を酸化する物質としては、過ヨウ素酸カリウムの他に、活性酸化マンガン、塩化鉄、p-ベンゾキノン等が効果があった。上記の物質は、酸化力はあるが、反応が遅やかで、酵素反応層への影響が少なかった。

## 実施例3

試料液として、血液や血清を用いる場合、還元性の物質の主なものは、アスコルビン酸であることが知られている。そこで、血糖を測定するセンサの試料供給部にアスコルビン酸オキシダーゼおよびカタラーゼを担持した。

血清を滴下すると、試料中のアスコルビン酸がアスコルビン酸オキシダーゼにより酸化され、過酸化水素が生成し、カタラーゼにより分解される。そのため、アスコルビン酸の影響なしに血糖の測定が可能となった。酵素を用いているために、温和な状態で、速やかにアスコルビン酸の選択的な除去ができ、酵素反応層へ与える影響も少なかった。アスコルビン酸オキシダーゼおよびカタラーゼは同時に架橋して固定化して担持することができるため、血清や血液が滴下されたとき溶け出さないうで反応し、グルコースセンサの酵素反応層や電極部に妨害を与えることがなかった。尿酸に対してはアスコルビン酸オキシダーゼの代わりにウリカーゼを用いることでその影響を除去すること

で第4図のようにふさいだ。血液を試料供給口へ付着させるとナイロン不織布を通過して酵素反応層5へ流れた。そのあいだに、試料中のアスコルビン酸が反応して除去されるとともに血球などの大きな分子がナイロン不織布に吸着して除去され試料の粘度が下がるため、反応速度が増した。妨害物質の担体としては、ナイロン不織布の他にバルブ、ガラス繊維、ポリカーボネート多孔体膜などが使用できた。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として上記実施例ではグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、等を用いることができる。また、電子受容体として、上記実施例に用いたフェリシアニ化カリウムが安定に反応するので適しているがパーベンゾキノンを使えば、反応速度が大きい

ができた。

## 実施例4

実施例2に示した構成のセンサに第3図に示すようにカバー7をつけた。このカバーの試料供給部にアスコルビン酸オキシダーゼ及びカタラーゼを固定化して担持し界面活性剤を付加した。血液をカバー7の試料供給部に供給すると、界面活性剤によりすみやかに妨害物質除去部8に導入され固定化された上記酵素と反応後、電極部2、3に広がり、酵素反応層5で反応が進み再現の良い応答が得られた。カバー7内の容積を小さくすることで、サンプル量およびアスコルビン酸オキシダーゼとカタラーゼの担持量を微量にすることができた。さらに、カバー7で囲むことにより、外気と遮断できるため、カバー7内の試料の蒸発を防ぐことが出来た。

## 実施例5

実施例4に示したカバー付のバイオセンサにおいて、その試料供給口をアスコルビン酸オキシダーゼ及びカタラーゼを固定化したナイロン不織布

ので高速化に適している。また、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 $\beta$ -ナフトキノ4-スルホン酸カリウム、フェロセン等が使用できる

## 発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を形成し、さらに、妨害物質除去部として溶解して酸化反応をする物質を付加したり、酵素を担持することにより、あらかじめ生体試料中に存在する還元性の物質は除去して極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、測定精度を向上させたものである。

また、電子受容体層を形成するとき界面活性剤を添加することにより、微量の電子受容体を均一にかつはがれにくい薄膜層に担持でき、保存性や大量生産に大きな効果がある。

## 4. 図面の簡単な説明

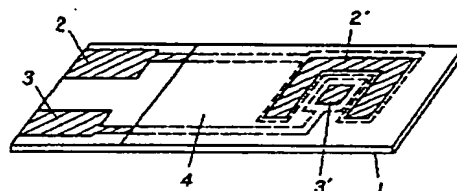
第1図は本発明の一実施例におけるバイオセンサの斜視図、第2図、第3図、第4図は同バイオセンサの縦断面図、第5図は従来例のバイオセンサの縦断面図である。

1...基板、2...対極、3...測定極、4...絶縁層、5...酵素反応層、6...妨害物質除去部、7...カバー。

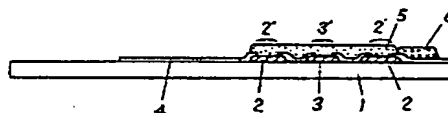
代理人の氏名 弁理士 栗野重孝 ほか1名

- 1 一 基 板
- 2 一 対 極
- 3 一 測 定 極
- 4 一 絶 縁 層
- 5 一 酵 素 反 応 層
- 6 一 妨 害 物 質 除 去 部

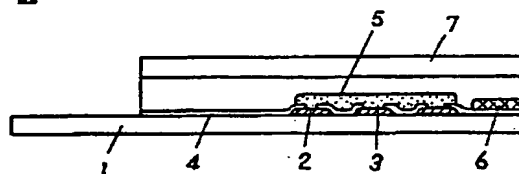
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

